



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 Patentschrift
10 DE 197 32 086 C 2

21 Aktenzeichen: 197 32 086.4-41
22 Anmeldetag: 25. 7. 1997
43 Offenlegungstag: 28. 1. 1999
45 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 21. 11. 2002

51 Int. Cl. 7:
C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/06
C 12 Q 1/14
G 01 N 33/569
// (C12Q 1/14,C12R
1:46)(C12Q 1/06,C12R
1:01)

DE 197 32 086 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

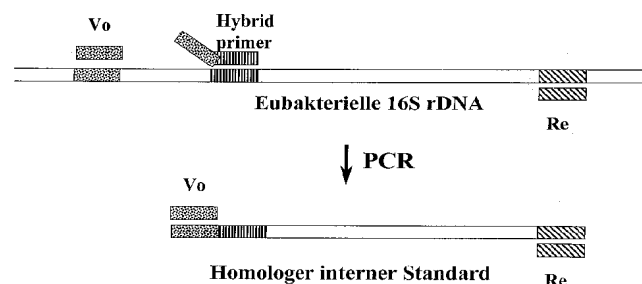
73 Patentinhaber:
Universität Leipzig, 04109 Leipzig, DE
74 Vertreter:
Nenning, P., Dipl.-Chem. Dipl.-Jur.Dr.rer.nat.Dr.jur.,
04275 Leipzig

72 Erfinder:
Eschrich, Klaus, Prof. Dr., 04277 Leipzig, DE; Rupf,
Stefan, Dr., 04275 Leipzig, DE
56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:
EP 06 92 540 A2
WO 92 05 280 A1
Chemical Abstracts 126 (9.6.97):302144z;
Blok, H.J. et al.: Bio Techniques 22 (1997)
700-704;
Chemical Abstracts 125 (1996):239926t; Lee,
Soo-Youn et al.; Appl.Environ.Microbiol. 62
(1996) 3787-3793;

54 Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien

57 Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Streptococcus mutans dadurch gekennzeichnet, daß eine biologische Probe entnommen wird, in einen Ansatz einer kompetitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an für Streptococcus mutans spezifischen Teilsequenzen im 16S-rRNA-Gen binden und der Ansatz eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Vorwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatessequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Rückwärts-Primers trägt, hergestellt wurde und der an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebensstoffe enthält, der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 40 mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird: initiale Denaturierung: 10 min 95°C, Denaturierung: 1 min 95°C, Annealing: 1 min 55°C, Extension: 1 min 72°C, Final Extension: 10 min 72°C und quantitativ die beiden entstandenen Produkte entweder nach Auftrennung der Amplifikate in der Agarosegelelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigenin-markierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper bestimmt werden und anschließend aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Menge des zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.

Prinzip der Herstellung des homologen internen Standards



DE 197 32 086 C 2

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung der Gesamtzahl von Eubakterien sowie der Anzahl von Eubakterien einzelner Spezies.

[0002] Es ist bereits bekannt, Eubakterien nachzuweisen und ihre Zahl zu erfassen. Im allgemeinen erfolgt dabei keine Differenzierung der Bakterienspezies, zumindest ist diese nicht ausreichend. So hat das Kultivieren von Eubakterien auf Nährmedien den Nachteil, daß viele Bakterienarten gar nicht angesprochen und zum Wachstum veranlaßt werden. Die Ursache liegt in der mangelnden Eignung der kommerziellen oder üblichen Nährmedien. Viele Bakterienarten wachsen nur recht und schlecht, was auch auf die bisher unzureichende Erforschung der Kultivierungsbedingungen für viele Bakterien zurückzuführen ist.

[0003] Für die quantitative Erfassung einzelner Bakterienspezies ist weiterhin die Unspezifität der Nährmedien nachteilig. Mehrere Keimspezies wachsen mit ähnlicher Intensität und verhindern eine Differenzierung. Es können auch nicht alle gewünschten Spezies erfaßt werden, weil eben nur lebende, unbeschädigte Zellen wachsen, während die anderen aus einem Nachweis herausfallen. Dazu kommt, daß die Stoffwechselprodukte der einen Spezies das Wachstum der anderen stören können, so daß eine weitere Meßergebnisverfälschung Platz greift.

[0004] Nachteilig sind auch Zeitbedarf und Kosten. Der Zeitbedarf resultiert aus der gegebenen Geschwindigkeit der Zellvermehrung, die Kosten aus der Notwendigkeit der Verwendung spezieller Substrate, dem Einhalten spezifischer Kulturbedingungen und der Pflege der Kulturen, die apparativen und manuellen Aufwand erfordert.

[0005] Ein Teil der Bakterien darf aus Gründen erlassener Vorschriften nur mit Testkits untersucht werden. Diese sind teuer. Der Ausweg wäre das Durchführen der Arbeiten in einem zertifizierten Labor. Das ist noch teurer und für Routineuntersuchungen nicht mehr denkbar.

[0006] Es ist weiterhin bekannt, Eubakterien durch Phasenkontrast- und/oder Dunkelfeldmikroskopie nachzuweisen und zu bestimmen.

[0007] Das hat aber den Nachteil, daß die Identifizierung subjektiv verfälscht ist. Ursache dafür ist die Beurteilung des Gesichtsfeldes im Mikroskop durch einen zwar erfahrenen Mikrobiologen, der aber doch auf visuelle Weise arbeitet mit den daraus resultierenden Fehlerquellen. Auf diese Weise können Gruppen von Bakterienspezies identifiziert werden, meist keine einzelnen Arten. Der Grund ist in der habituellen Ähnlichkeit der Untersuchungsobjekte zu sehen. Nachteilig ist weiterhin, daß der Analyt nur im status quo untersucht werden kann. Das kommt daher, daß unter den Analysebedingungen die Bakterien nicht wachsen können.

[0008] Weiterhin sind Arbeiten bekannt geworden, Eubakterien über ihre Stoffwechselprodukte zu identifizieren. Allerdings sind viele Bakterien so nicht zu erfassen. Das liegt daran, daß nur eine begrenzte Anzahl von Stämmen und Arten spezifisch nachweisbare Stoffwechselprodukte freisetzt. Das wiederum führt dazu, daß Gruppen von Bakterien erfaßt werden, weil verwandte Arten auch ähnliche Stoffwechselprodukte ausscheiden. Und eine Quantifizierung der Bakterien über ihre Stoffwechselprodukte ist gleich gar nicht möglich, weil die Intensität des Stoffwechsels weder steuerbar noch reproduzierbar ist.

[0009] Es ist darüber hinaus bekannt, Eubakterien mit immunologischen Methoden nachzuweisen. Diese Methoden sind teuer. Ursache ist das notwendige Verwenden polyklonaler Antisera oder monoklonaler Antikörper, die nur unter hohem Zeit- und Mitteleinsatz selbst herzustellen oder teuer zu erwerben sind. Diese Methoden haben sich daher nicht

allgemein durchsetzen können. Eine Quantifizierung einzelner Bakterienspezies mittels immunologischer Methoden ist nur bedingt möglich, da die Expression von Antigenen starken Schwankungen unterliegen kann. Für eine Erfassung der Gesamtbakterienzahl eignen sich immunologische Verfahren wegen der hohen Spezifität der Antikörper prinzipiell nicht.

[0010] Schließlich sind nucleinsäurebasierte Methoden bekannt. Diese werden in Hybridisierungsmethoden und in Polymerasekettenreaktion (PCR)-Verfahren unterschieden. Die Hybridisierungsmethoden setzen die Kenntnis geeigneter, meist mehrere hundert Basenpaare langer Zielsequenzen voraus. Bisher zeigt sich, daß die erreichte Sensitivität der Hybridisierungsverfahren unzureichend ist. Die Ursache liegt darin, daß nur die gerade vorhandene Zahl von Bakterien nachgewiesen wird und keine Vermehrung des Analyten geschieht. Die bisher eingesetzten sekundären Verstärkungsmittel sind störanfällig und verhindern letztlich eine ausreichend genaue Quantifizierung. Hohe Sensitivität ist nur durch radioaktive Methoden zu erreichen. Die Begleitumstände aber sind eine aufwendige Methodik und Schwierigkeiten bei der Entsorgung der radioaktiven Abfälle.

[0011] Die PCR setzt die Kenntnis zweier kurzer, in geeignetem Abstand (hundert bis 2000 Basenpaare) voneinander entfernter Sequenzen für die Primerbindung voraus. Sie ist, neben der Kultivierung, die einzige Keimnachweismethode, bei der eine Vermehrung des Analyten erfolgt. Der Keimnachweis erfolgt über die Amplifikation der Zielsequenz (Template). Die PCR ist eine qualitative Methode. Zwischen Template- und Produktmenge besteht ein extrem nichtlinearer, von zahlreichen experimentell schwer kontrollierbaren Einflußgrößen bestimmter Zusammenhang. Daher erlaubt die PCR beim Bakteriennachweis nur eine ja/nein-Antwort, bestenfalls eine halb-quantitative Abschätzung der Keimzahlen, jedoch keine Quantifizierung. Die Kombination von hoher Sensitivität und fehlender Quantifizierbarkeit führt leicht zu falsch-positiven Ergebnissen. Damit ist die PCR für den Nachweis von Bakterien oft zu empfindlich und hat sich deshalb bisher in der Praxis nicht durchsetzen können.

[0012] Es ist weiterhin die technische Lehre des EP 0 692 540 A2 bekannt. Diese europäische Patentanmeldung beschreibt die Verwendung von Oligonukleotidprimern, die zur Amplifikation einer Sequenz dienen, die charakteristisch für Eubakterien ist. Ein Nachteil besteht darin, daß es sich dabei nur um ein rein qualitatives Verfahren, d. h. ein Nachweisverfahren, für Bakterien handelt. Solche PCR-basierte Nachweisverfahren gibt es, auch für einzelne Bakterienspezies, zahlreiche. Die Autoren der vorliegenden Patentanmeldung haben früher selbst solche Verfahren entwickelt und publiziert (Furcht, C., Eschrich, K. und Merte K. Detection of Eikenella corrodens and Actinobacillus actinomycetemcomitans by use of the polymerase chain reaction (PCR) in vitro and in subgingival plaque) J Clin Periodontol 23: 891-897 (1996).

[0013] Der entscheidende Nachteil aller dieser Verfahren, und damit die Ursache dafür, daß diese Verfahren keine breite Anwendung fanden, liegt in der hohen Sensitivität der PCR und in deren qualitativem Charakter. Dies führt dazu, daß bei Optimierung der PCR-Bedingungen bereits ein oder wenige Bakterien je Probe nachweisbar sind und sich die Ergebnisse für ein Bakterium oder 1 Million Bakterien je Probe nicht signifikant unterscheiden. Damit fallen bei biologischen Proben fast alle PCR-Tests positiv aus und der Informationsgewinn ist sehr gering. Erforderlich ist eine technische Lösung, die zu einer quantitativen Bestimmung mittels einer speziell konzipierten PCR führt.

[0014] EP 0 692 540 A2 beschreibt ein Verfahren zum

Nachweis von Eubakterien in ihrer Gesamtheit und gibt dazu einen Testkit an. Auf einen Nachweis einzelner Bakterienspezies ist nicht hingewiesen. Der Nachweis einzelner Bakterienspezies mit den gleichen Primern und Sonden ist nicht möglich.

[0015] Die Patentanmeldung WO 92/05280 A1 beschreibt ebenfalls ein nur qualitatives Verfahren zum Nachweis von Bakterien. Das angegebene Verfahren beruht – abgesehen von seiner nur qualitativen Natur – aber auch auf einem anderen Prinzip als das nachfolgend offenbarte. Die PCR kann in WO 92/05280 A1 als vorgeschaltete Hilfsreaktion zur Vermehrung der Proben-DNA dienen, ist aber dazu nicht zwingend erforderlich. Unabhängig davon, welche Bakterien nachgewiesen werden sollen, werden stets die gleichen Primer, die sich an konservierte Sequenzen binden, verwendet. Die in WO 92/05280 A1 beschriebene Methode besteht im eigentlichen Nachweis der unterschiedlichen Spezies, der durch eine Serie von Hybridisierungsreaktionen mit verschiedenen Sonden, die alle an 16S rDNA binden, erfolgt. Es sind stets möglichst viele Hybridisierungsreaktionen mit verschiedenen Sonden erforderlich. Das Ergebnis jeder einzelnen Hybridisierung bedeutet für sich allein nichts. Ergebnis der Methode ist die "Hybridisation signature", die sich aus einer Kombination von Bindungswahrscheinlichkeiten ergibt. Die in WO 92/05280 A1 verwendeten Sonden sind 5–10, eventuell 4–15 Basenpaare lang. Die vorliegend eingereichte Erfindung bewirkt aber, daß die PCR als quantitative PCR die eigentliche Bestimmungsmethode ist, die den Nachweis unvermeidlich einschließt. Die PCR-Primer unterscheiden sich in Abhängigkeit vom Bestimmungsojekt. Zur Ermittlung der Mengen an PCR-Produkten können, müssen aber nicht, Sonden eingesetzt werden. Wenn Sonden verwendet werden, dann reichen genau zwei Sonden für eine quantitative Bestimmung. Es wird keine "Hybridisation signature" ermittelt, sondern die Menge der PCR-Produkte wird nach Bindung der Sonden quantitativ bestimmt. Die Sonden werden so konstruiert, daß sie exakt binden. Bindungswahrscheinlichkeiten spielen also keine Rolle.

[0016] Aus einer Publikation von Blok, J. J. et al. aus 1997 (Bio Techniques 22 (1997) 700–704) ist bekannt, daß für die Quantifizierung der PCR-Produkte das QPCR-System 5000 (Applied Biosystems) eingesetzt wird. Dieses Gerät erlaubt und erfordert eine Quantifizierung der PCR-Produkte während der exponentiellen Phase der Reaktion. Blok et al. benutzen jeweils eine der DNA-Proben als Kompetitor für die Amplifikation einer zweiten Probe (in der Arbeit titrieren sie *Pseudomonas aeruginosa* 16S rDNA gegen *E. coli* 16S rDNA und umgekehrt). Dies bedeutet, sie benutzen

- 1) einen heterologen Standard und
- 2) sie benutzen vorgefundene DNA als Standard.

[0017] Die Verwendung eines heterologen Standards erzwingt eine Bestimmung vor der stationären Phase der PCR und eine vergleichende Überprüfung der Amplifikationseffizienz in jedem konkreten Fall (wie in Fig. 1, Blok et al., 1997, dargestellt).

[0018] Die Autoren des vorliegenden Patents stellen die DNA-Standards unter Verwendung eines jeweils speziell entworfenen Hybridprimers selbst her (nachfolgend Abb. 1). Damit wird ein homologer Standard synthetisiert, der, verglichen mit der jeweils zu amplifizierenden DNA, keinerlei fremde Sequenzen enthält. Dies wiederum erlaubt es, in jedem Fall von praktisch identischen Amplifikationseffizienzen von Proben- und Standard-DNA auszugehen und ermöglicht dadurch die Analyse der PCR-Produkte in der stationären Phase der PCR.

[0019] Lee et al. (Appl. Environ. Microbiol. 62 (1996) 3787–3793) beschreiben die Isolierung von DNA aus einer Bodenprobe mittels quantitativer PCR. Allerdings wird

- 1) kein homologer, sondern ein heterologer innerer Standard für die quantitative PCR verwendet, der
- 2) durch Einfügen eines 121 Basenpaare langen Fremd-(gleich Plasmid-)DNA-Fragments in eine Restriktionsstelle
- 3) innerhalb klonierter 16S rDNA hergestellt wird. Die Einfügung fremder DNA in einen Standard erfordert eine vergleichende Überprüfung der Amplifikationseffizienz in jedem konkreten Fall.

[0020] Demgegenüber stellen wir

- 1) homologe DNA-Standards
- 2) unter Verwendung eines jeweils speziell entworfenen Hybridprimers
- 3) mittels PCR her.

[0021] Die in Lee et al. (1996) zitierte Arbeit von Zachara et al., Null. Aids Res., 1993, beschreibt das Prinzip der Methode der kompetitiven PCR mit kloniertem homologem inneren Standard. Der Standard wird mittels Deletion aus klonierter Wildtyp-DNA hergestellt. Auf eine mögliche Anwendung dieser Methode zur Quantifizierung von Mikroorganismen findet sich kein Hinweis.

[0022] Die beschriebenen Nachteile des bekannten Wissensstandes und die Analyse ihrer Ursachen bestätigt die Notwendigkeit, Möglichkeiten zu einer passablen Lösung des Problems der quantitativen Bestimmung einzelner Eubakterienspezies zu suchen.

[0023] Die Erfindung hat demgemäß das Ziel, eine einfache, schnelle und preiswerte Methodik anzugeben, nach der Eubakterien nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden können.

[0024] Die Aufgabe ist darin zu sehen, in Ausgangsproben völlig unterschiedlicher Herkunft, zum Beispiel in humanem Gewebe, in Sputum, aber auch in Abwasser, Kompostabluft und dergleichen Eubakterien zu bestimmen. Dabei soll eine Gesamtbestimmung der Bakterien ebenso möglich sein wie der Einzelnachweis und die entsprechende Bestimmung einzelner Bakterienspezies. Jedermann soll den Bakterientest durchführen können, unabhängig von der Pathogenität der nachzuweisenden Erreger.

[0025] Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß wie folgt verfahren wird.

[0026] Von den verschiedenen methodischen Varianten der quantitativen PCR wird die kompetitive qPCR mit homologem inneren Standard als Grundlage gewählt. Eine solche qPCR-Methode wird zur Bestimmung der Gesamtbakterienzahl verwendet (Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien in ihrer Summe). Dazu werden durch Datenbankanalyse hochkonservierte Teilsequenzen in den 16S rRNA-Genen von Eubakterien gesucht und zwei dazu komplementäre PCR-Primer (Vorwärts- und Rückwärts-Primer) synthetisiert. Mit diesen Primern ist ein PCR-Nachweis von Eubakterien unterschiedlicher Spezies möglich. Dagegen werden mit Archaeobakterien und Eukaryonten keine Amplifikate erhalten. Zur Gewinnung des homologen Standards wird ein Hybrid-Primer entworfen, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatessequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Vorwärts- oder Rückwärts-Primers trägt. Mit dem Hybrid-Primer und dem Rückwärts-Primer wird durch PCR mit *E. coli* DNA als Template der Standard synthetisiert. Bei Zugabe bekannter Mengen dieses Stan-

dards zu bakterienhaltigen Proben und anschließender PCR mit dem Vorwärts- und dem Rückwärts-Primer wird ein Amplifikatgemisch erhalten, dessen Zusammensetzung aus PCR-Produkt von Bakterien-DNA und PCR-Produkt vom Standard exakt das Verhältnis der Moleküle von Bakterien-DNA und Standard in der Probe widerspiegelt. Aus diesem Verhältnis und der bekannten Menge zugesetzten Standards kann die in der Probe vorhandene Menge Bakterien-DNA bestimmt werden. Da die DNA-Menge pro Zelle konstant ist, erlaubt das Ergebnis eine Ermittlung der Zellzahl. Die Bestimmung der Mengenverhältnisse der PCR-Produkte von Bakterien-DNA und Standard-DNA erfolgt entweder

- nach Auftrennung der Amplifikate in der Agarosegelelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder
- (bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form) nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigeninmarkierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay (ELOSA) unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper.

[0027] Die quantitative Bestimmung einzelner Bakterien-spezies erfolgt mit analogen Methoden der kompetitiven PCR. Abweichend zum obigen Vorgehen werden dabei durch Datenbankanalyse gerade speziesspezifische Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen des jeweiligen Bakteriums gesucht und zwei dazu komplementäre PCR-Primer (Vorwärts- und Rückwärts-Primer) synthetisiert. Die Spezifität dieser Primer wird in PCR überprüft, die PCR-Bedingungen entsprechend optimiert. Zur Gewinnung des homologen Standards wird ein Hybrid-Primer entworfen, der an eine Basenfolge innerhalb der mit den Primern amplifizierten Templatessequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Vorwärts-Primers trägt. Mit dem Hybrid-Primer und dem Rückwärts-Primer wurde durch PCR mit DNA der zu quantifizierenden Bakterienspezies als Template der Standard synthetisiert. Bei Zugabe bekannter Mengen dieses Standards zu bakterienhaltigen Proben und anschließender PCR mit dem Vorwärts- und dem Rückwärts-Primer wird ein Amplifikatgemisch erhalten, dessen Zusammensetzung aus PCR-Produkt von Bakterien-DNA und PCR-Produkt vom Standard exakt das Verhältnis der Moleküle von Bakterien-DNA und Standard in der Probe widerspiegelt. Aus diesem Verhältnis und der bekannten Menge zugesetzten Standards kann die in der Probe vorhandene Menge Bakterien-DNA bestimmt werden. Da die DNA-Menge pro Zelle konstant ist, erlaubt das Ergebnis eine Ermittlung der Zellzahl. Die Bestimmung der Mengenverhältnisse der PCR-Produkte von Bakterien-DNA und Standard-DNA erfolgt wie oben für die eubakterienspezifische PCR beschrieben.

[0028] Die Spezies-spezifischen Methoden der kompetitiven PCR wurden von uns bisher für mehrere zahn- und zahnbetterkrankungsrelevante pathogene Bakterien entwickelt. Sie eignen sich jedoch prinzipiell zur Quantifizierung aller Eubakterien, für die 16S rRNA-Gensequenzen bekannt sind.

Ausführungsbeispiele

1. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien in ihrer Summe

Vorwärts-Primer: ACTACGTGCCAGCAGCC
Rückwärts-Primer: GGACTACCAGGGTATCTAATCC
Hybrid-Primer: ACTACGTGCCAGCAGCCGCAAGTCA-

GATGTGAAATCC

1.1. Synthese des homologen Kompetitors (Standard)

5 [0029] Mit Hybrid-Primer und Rückwärts-Primer wird eine PCR unter Verwendung von E. coli DNA als Template durchgeführt.

[0030] Reaktionsbedingungen:

Ansatzvolumen: 50 µl

10 Primerkonzentration: je 40 pmol/Ansatz

dNTPs: je 2,5 nMol/Ansatz

Magnesiumchlorid: 0,1 µMol/Ansatz

Puffer: 5 µl 10 × Taq-Puffer

Template: 1 ng E. coli DNA

15 Taq-Polymerase: 1.25 U Ampli-Taq Gold (Applied Biosystems)

Thermocycler: GeneAmp 2400 (Applied Biosystems)

Temperaturprofil: initiale Denaturierung: 10 min 95°C

Zyklen:

20 Denaturierung: 1 min 95°C

Annealing und Extension: 1 min 66°C

Anzahl: 40

Final Extension: 10 min 66°C

[0031] Nach Behandlung mit Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I wurde das PCR-Produkt (= Standard, 25 229 Basenpaare) in die SmaI-Stelle von pUC18 kloniert.

1.2. Ermittlung einer Eichkurve

30 Vorwärts-Primer: ACTACGTGCCAGCAGCC

Rückwärts-Primer: GGACTACCAGGGTATCTAATCC

[0032] Mit diesen Primern wird eine Serie von PCR durchgeführt.

[0033] Reaktionsbedingungen: wie oben, aber

35 Template:

350 Moleküle Standard

5–1000 Bakterien-Zellen

Thermocycler, Temperaturprofil und Zyklen wie oben.

40 Produkte: Standard (229 Basenpaare), Bakterien-PCR-Produkt (294 Basenpaare)

1.3. Quantitative Bestimmung PCR-Produkte

1.3.1. Auftrennung der Produkte von 1.2. auf 2% Agarosegel, Anfärben mit Ethidiumbromid, videodensitometrische Bestimmung der Mengen der beiden PCR-Produkte

1.3.2

50 [0034] (Bei Verwendung des Rückwärts-Primers in 5'-biotinylierter Form) nach Teilung des PCR-Produkts in zwei Aliquote erfolgt Bindung an mit Streptavidin beschichtetes Reaktionsgefäß (Mikrotiterplatte), Denaturierung mit NaOH, Hybridisierung mit je einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde,

eine spezifisch für die Sequenz, die den Amplifikaten von Bakterien-DNA und Standard gemeinsam ist (DIG-GCTCAGGTGCGAAAGCGTGG) und eine die an die Sequenz bindet, die im PCR-Produkt von Bakterien-DNA, nicht aber im PCR-Produkt vom Standard vorhanden ist (DIG-CGGAGGGTGCAAGCGTTAATC).

60 [0035] Anschließend absorptionsphotometrische quantitative Bestimmung der gebundenen Sondenmengen mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay (ELOSA) unter Verwendung Peroxidase-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper; Auswertung im Mikrotiterplattenphotometer (Anthos).

1.4. Erstellen einer Eichkurve

[0036] Auftragen des Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Bakterien gegen die vorgelegte Bakterienzahl (unter Berücksichtigung von 7 Kopien des 16S rRNA-Gens je Bakteriengenom).

1.5. Quantitative Bestimmung von Eubakterien

wie unter 1.2 aber anstelle der E. coli-Zellen 2 µl bakterienhaltige Probe.

Behandlung der PCR-Produkte wie unter 1.3.

Auswertung des gemessenen Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Probe mittels Eichkurve (1.4.).

2. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien einer Spezies am Beispiel der Bestimmungsmethode für Streptococcus mutans

Vorwärts-Primer: GGTCAGGAAAGTCTGGAGTAA-AAGGCTA

Rückwärts-Primer: GCGTTAGCTCCGGCACTAAGCC

Hybrid-Primer: GCGTTAGCTCCGGCAC-TAAGCCGCTACCCACGCTTTCGAGC

2.1. Synthese des homologen Kompetitors (Standard)

[0037] Mit Hybrid-Primer und Vorwärts-Primer wird eine PCR unter Verwendung von Streptococcus mutans DNA als Template durchgeführt.

[0038] Reaktionsbedingungen:

Ansatzvolumen: 50 µl

Primerkonzentration: je 40 pmol/Ansatz

dNTPs: je 2,5 nMol/Ansatz

Magnesiumchlorid: 0,1 µMol/Ansatz

Puffer: 5 µl 10 × Taq-Puffer

Template: 1 ng Streptococcus mutans DNA

Taq-Polymerase: 1.25 U Ampli-Taq Gold (Applied Biosystems)

Thermocycler: GeneAmp 2400 (Applied Biosystems)

Temperaturprofil: initiale Denaturierung: 10 min 95°C

Zyklen:

Denaturierung: 1 min 95°C

Annealing: 1 min 55°C

Extension: 1 min 72°C

Anzahl: 40

Final Extension: 10 min 72°C

[0039] Nach Behandlung mit Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I wurde das PCR-Produkt (= Standard, 217 Basenpaare) in die SmaI-Stelle von pUC18 kloniert.

2.2. Ermittlung einer Eichkurve

Vorwärts-Primer: GGTCAGGAAAGTCTGGAGTAA-AAGGCTA

Rückwärts-Primer: GCGTTAGCTCCGGCACTAAGCC

[0040] Mit diesen Primern wird eine Serie von PCR durchgeführt.

[0041] Reaktionsbedingungen: wie oben, aber

Template:

350 Moleküle Standard

5–1000 Zellen Streptococcus mutans

Thermocycler, Temperaturprofil und Zyklen wie oben.

Produkte: Standard (217 Basenpaare), Bakterien-PCR-Produkt (282 Basenpaare)

2.3. Quantitative Bestimmung PCR-Produkte

2.3.1. Auftrennung der Produkte von 2.2. auf 2% Agarosegel, Anfärben mit Ethidiumbromid, videodensitometrische Bestimmung der Mengen der beiden PCR-Produkte

2.3.2

[0042] (Bei Verwendung des Rückwärts-Primers in 5'-biotinylierter Form) nach Teilung des PCR-Produkts in zwei Aliquote Bindung an mit Streptavidin beschichtetes Reaktionsgefäß (Mikrotiterplatte), Denaturierung mit NaOH, Hybridisierung mit je einer Digoxigeninmarkierten DNA-Sonde,

15 eine spezifisch für die Sequenz, die den Amplifikaten von Streptococcus mutans-DNA und Standard gemeinsam ist (DIG-CGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTAGGC) und eine die an die Sequenz bindet, die im PCR-Produkt von Streptococcus mutans-DNA, nicht aber im PCR-Produkt vom Standard vorhanden ist (DIG-GGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTG).

[0043] Anschließend absorptionsphotometrische quantitative Bestimmung der gebundenen Sonden Mengen mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent assay (ELISA) unter Verwendung Peroxidase-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper; Auswertung im Mikrotiterplattenphotometer (Anthos).

2.4. Erstellen einer Eichkurve

[0044] Auftragen des Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Bakterien gegen die vorgelegte Bakterienzahl (unter Berücksichtigung von 7 Kopien des 16S rRNA-Gens je Bakteriengenom).

2.5. Quantitative Bestimmung von Streptococcus mutans

wie unter 2.2 aber anstelle der Streptococcus mutans-Zellen 2 µl bakterienhaltige Probe.

Behandlung der PCR-Produkte wie unter 2.3.

Auswertung des gemessenen Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Probe mittels Eichkurve (2.4.).

3. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien einer Spezies am Beispiel der Bestimmungsmethode für Actinobacillus actinomycetemcomitans

Vorwärts-Primer: GTT TAGCCCTGGTGCCCGAAG

Rückwärts-Primer: TGACGGGCGGTGTTACAAGG

Hybrid-Primer: GTT TAGCCCTGGTGCCCGAAGCA-CAAGCGGTGGAGCATGTGG

3.1. Synthese des homologen Kompetitors (Standard)

55 [0045] Mit Hybrid-Primer und Rückwärtsprimer wird eine PCR unter Verwendung von Actinobacillus actinomycetemcomitans DNA als Template durchgeführt.

[0046] Reaktionsbedingungen:

Ansatzvolumen: 50 µl

60 Primerkonzentration: je 40 pmol/Ansatz

dNTPs: je 2,5 nMol/Ansatz

Magnesiumchlorid: 0,1 µMol/Ansatz

Puffer: 5 µl 10 × Taq-Puffer

Template: 1 ng Actinobacillus actinomycetemcomitans DNA

65 Taq-Polymerase: 1.25 U Ampli-Taq Gold (Applied Biosystems)

Thermocycler: GeneAmp 2400 (Applied Biosystems)

Temperaturprofil: initiale Denaturierung: 10 min 95°C

Zyklen:

Denaturierung: 1 min 95°C

Annealing: 1 min 55°C

Extension: 1 min 72°C

Anzahl: 40

Final Extension: 10 min 72°C

[0047] Nach Behandlung mit Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I wurde das PCR-Produkt (= Standard, 473 Basenpaare) in die SmaI-Stelle von pUC18 kloniert.

3.2. Ermittlung einer Eichkurve

Vorwärts-Primer: GTTTAGCCCTGGTGCCCGAAG

Rückwärts-Primer: TGACGGGCGGTGTGTACAAGG

[0048] Mit diesen Primern wird eine Serie von PCR durchgeführt.

[0049] Reaktionsbedingungen: wie oben, aber

Template: 350 Moleküle Standard

5–1000 Zellen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Thermocycler, Temperaturprofil und Zyklen wie oben.

Produkte: Standard (473 Basenpaare), Bakterien-PCR-Produkt (547 Basenpaare)

3.3. Quantitative Bestimmung PCR-Produkte

3.3.1. Auftrennung der Produkte von 3.2. auf 2% Agarosegel, Anfärben mit Ethidiumbromid, videodensitometrische Bestimmung der Mengen der beiden PCR-Produkte

3.3.2

[0050] (Bei Verwendung des Vorwärts-Primers in 5'-biotinylierter Form) nach Teilung des PCR-Produkts in zwei Aliquote Bindung an mit Streptavidin beschichtetes Reaktionsgefäß (Mikrotiterplatte), Denaturierung mit NaOH, Hybridisierung mit je einer Digoxigeninmarkierten DNA-Sonde, eine spezifisch für die Sequenz, die den Amplifikaten von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-DNA und Standard gemeinsam ist

(DIG-GCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAACCCG) und eine die an die Sequenz bindet, die im PCR-Produkt von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-DNA, nicht aber im PCR-Produkt vom Standard vorhanden ist (DIG-GTTTTAACCTTGCGGCCGTACTGGG).

[0051] Anschließend absorptionsphotometrische quantitative Bestimmung der gebundenen Sondenmengen mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent assay (ELISA) unter Verwendung Peroxidase-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper; Auswertung im Mikrotiterplattenphotometer (Anthos).

3.4. Erstellen einer Eichkurve

[0052] Auftragen des Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Bakterien gegen die vorgelegte Bakterienzahl (unter Berücksichtigung von 7 Kopien des 16S rRNA-Gens je Bakteriengenom).

3.5. Quantitative Bestimmung von *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

wie unter 3.2 aber anstelle der *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-Zellen 2 µl bakterienhaltige Probe.

Behandlung der PCR-Produkte wie unter 3.3.

Auswertung des gemessenen Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Probe mittels Eichkurve (3.4.).

4. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien einer Spezies am Beispiel der Bestimmungsmethode für *Porphyromonas gingivalis*

5 Vorwärts-Primer: GGGATTGAAATGTAGATGACTGATG

Rückwärts-Primer: CCTTCAGGTACCCCCGACT

Hybrid-Primer: GGGATTGAAATGTAGATGACTGATGTCAGCTCGTGCCGTGAG

4.1. Synthese des homologen Kompetitors (Standard)

[0053] Mit Hybrid-Primer und Rückwärtssprimer wird eine PCR unter Verwendung von *Porphyromonas gingivalis* DNA als Template durchgeführt.

15 [0054] Reaktionsbedingungen:

Ansatzvolumen: 50 µl

Primerkonzentration: je 40 pmol/Ansatz

dNTPs: je 2,5 nMol/Ansatz

Magnesiumchlorid: 0,1 µMol/Ansatz

20 Puffer: 5 µl 10 × Taq-Puffer

Template: 1 ng *Porphyromonas gingivalis* DNA

Taq-Polymerase: 1.25 U Ampli-Taq Gold (Applied Biosystems)

25 Thermocycler: GeneAmp 2400 (Applied Biosystems)

Temperaturprofil: initiale Denaturierung: 10 min 95°C

Zyklen:

Denaturierung: 1 min 95°C

Annealing: 1 min 55°C

Extension: 1 min 72°C

30 Anzahl: 40

Final Extension: 10 min 72°C

[0055] Nach Behandlung mit Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I wurde das PCR-Produkt (= Standard, 400 Basenpaare) in die SmaI-Stelle von pUC18 kloniert.

4.2. Ermittlung einer Eichkurve

Vorwärts-Primer: GGGATTGAAATGTAGATGACTGATG

Rückwärts-Primer: CCTTCAGGTACCCCCGACT

40 [0056] Mit diesen Primern wird eine Serie von PCR durchgeführt.

[0057] Reaktionsbedingungen: wie oben, aber

Template:

350 Moleküle Standard

45 5–1000 Zellen *Porphyromonas gingivalis*

Thermocycler, Temperaturprofil und Zyklen wie oben.

Produkte: Standard (400 Basenpaare), Bakterien-PCR-Produkt (499 Basenpaare)

4.3. Quantitative Bestimmung PCR-Produkte

4.3.1. Auftrennung der Produkte von 4.2. auf 2% Agarosegel, Anfärben mit Ethidiumbromid, videodensitometrische Bestimmung der Mengen der beiden PCR-Produkte

4.3.2

[0058] (Bei Verwendung des Rückwärts-Primers in 5'-biotinylierter Form) nach Teilung des PCR-Produkts in zwei Aliquote Bindung an mit Streptavidin beschichtetes Reaktionsgefäß (Mikrotiterplatte), Denaturierung mit NaOH, Hybridisierung mit je einer Digoxigeninmarkierten DNA-Sonde, eine spezifisch für die Sequenz, die den Amplifikaten von *Porphyromonas gingivalis*-DNA und Standard gemeinsam ist (DIG-GTTTTAACCTTGCGGCCGTACTGGG) und eine die an die Sequenz bindet, die im PCR-Produkt von *Por-*

phyromonas gingivalis-DNA, nicht aber im PCR-Produkt vom Standard vorhanden ist (DIG-GCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAACCCG).

[0059] Anschließend absorptionsphotometrische quantitative Bestimmung der gebundenen Sondenmen-
gen mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent assay (ELOS) unter Verwendung Peroxidase-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper; Auswertung im Mikrotiterplattenphotometer (Anthos).

4.4. Erstellen einer Eichkurve

[0060] Auftragen des Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Bakterien gegen die vorgelegte Bakterienzahl (unter Berücksichtigung von 7 Kopien des 16S rRNA-Gens je Bakteriengenom).

4.5. Quantitative Bestimmung von Porphyromonas gingivalis

wie unter 4.2 aber anstelle der Porphyromonas gingivalis Zellen 2 µl bakterienhaltige Probe.

Behandlung der PCR-Produkte wie unter 4.3.
Auswertung des gemessenen Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Probe mittels Eichkurve (4.4.).

5. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien einer Spezies am Beispiel der Bestimmungsmethode für Prevotella intermedia

Vorwärts-Primer: AACGGCATTATGTGCTTGAC
Rückwärts-Primer: CTCAAGTCCGCCAGTTTCGCG
Hybrid-Primer:
CTCAAGTCCGCCAGTTTCGCGCCTGGACCTTCCGTA-
TTACC

5.1. Synthese des homologen Kompetitors (Standard)

[0061] Mit Hybrid-Primer und Vorwärtssprimer wird eine PCR unter Verwendung von Prevotella intermedia DNA als Template durchgeführt.

[0062] Reaktionsbedingungen:

Ansatzvolumen: 50 µl

Primerkonzentration: je 40 pmol/Ansatz

dNTPs: je 2,5 nMol/Ansatz

Magnesiumchlorid: 0,1 µMol/Ansatz

Puffer: 5 µl 10 × Taq-Puffer

Template: 1 ng Prevotella intermedia DNA

Taq-Polymerase: 1.25 U Ampli-Taq Gold (Applied Biosystems)

Thermocycler: GeneAmp 2400 (Applied Biosystems)

Temperaturprofil: initiale Denaturierung: 10 min 95°C

Zyklen:

Denaturierung: 1 min 95°C

Annealing: 1 min 60°C

Extension: 1 min 72°C

Anzahl: 40

Final Extension: 10 min 72°C

[0063] Nach Behandlung mit Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I wurde das PCR-Produkt (= Standard, 502 Basenpaare) in die SmaI-Stelle von pUC18 kloniert.

5.2. Ermittlung einer Eichkurve

Vorwärts-Primer: AACGGCATTATGTGCTTGAC
Rückwärts-Primer: CTCAAGTCCGCCAGTTTCGCG

[0064] Mit diesen Primern wird eine Serie von PCR durchgeführt.

[0065] Reaktionsbedingungen: wie oben, aber
Template:

350 Moleküle Standard

5–1000 Zellen Prevotella intermedia

5 Thermocycler, Temperaturprofil und Zyklen wie oben.

Produkte: Standard (502 Basenpaare), Bakterien-PCR-Produkt (489 Basenpaare)

5.3. Quantitative Bestimmung PCR-Produkte

5.3.1. Auftrennung der Produkte von 5.2. auf 2% Agarosegel, Anfärben mit Ethidiumbromid, videodensitometrische Bestimmung der Mengen der beiden PCR-Produkte

5.3.2

[0066] (Bei Verwendung des Rückwärts-Primers in 5'-biotinylierter Form) nach Teilung des PCR-Produkts in zwei Aliquote Bindung an mit Streptavidin beschichtetes Reaktionsgefäß (Mikrotiterplatte), Denaturierung mit NaOH, Hybridisierung mit je einer Digoxigeninmarkierten DNA-Sonde,

eine spezifisch für die Sequenz, die den Amplifikaten von Prevotella intermedia-DNA und Standard gemeinsam ist (DIG-GGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGG) und

eine die an die Sequenz bindet, die im PCR-Produkt von Prevotella intermedia-DNA, nicht aber im PCR-Produkt vom Standard vorhanden ist

30 (DIG-GGCGGTCTGTTAAGCGTGTGTGAAATT-TAGG).

[0067] Anschließend absorptionsphotometrische quantitative Bestimmung der gebundenen Sondenmen-
gen mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent assay (ELOS) unter Verwendung Peroxidase-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper; Auswertung im Mikrotiterplattenphotometer (Anthos).

5.4. Erstellen einer Eichkurve

[0068] Auftragen des Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Bakterien gegen die vorgelegte Bakterienzahl (unter Berücksichtigung von 7 Kopien des 16S rRNA-Gens je Bakteriengenom).

5.5. Quantitative Bestimmung von Prevotella intermedia

wie unter 5.2 aber anstelle der Prevotella intermedia Zellen 2 µl bakterienhaltige Probe.

50 Behandlung der PCR-Produkte wie unter 5.3.

Auswertung des gemessenen Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Probe mittels Eichkurve (5.4.).

6. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien einer Spezies am Beispiel der Bestimmungsmethode für Eikenella corrodens

Vorwärts-Primer: CGATTAGCTGTTGGGCAACTT

Rückwärts-Primer: ACCCTCTGTACCGACCATTTGTAT

Hybrid-Primer: ACCCTCTGTACCGACCATTTGTAT-
TACCTTCCTCCGGTTTGTG

6.1. Synthese des homologen Kompetitors (Standard)

65 [0069] Mit Hybrid-Primer und Vorwärtssprimer wird eine PCR unter Verwendung von Eikenella corrodens DNA als Template durchgeführt.

[0070] Reaktionsbedingungen:

Ansatzvolumen: 50 µl
 Primerkonzentration: je 40 pmol/Ansatz
 dNTPs: je 2,5 nMol/Ansatz
 Magnesiumchlorid: 0,1 µMol/Ansatz
 Puffer: 5 µl 10 × Taq-Puffer
 Template: 1 ng *Eikenella corrodens* DNA
 Taq-Polymerase: 1.25 U Ampli-Taq Gold (Applied Biosystems)
 Thermocycler: GeneAmp 2400 (Applied Biosystems)
 Temperaturprofil: initiale Denaturierung: 10 min 95°C
 Zyklen:
 Denaturierung: 1 min 95°C
 Annealing: 1 min 55°C
 Extension: 1 min 72°C
 Anzahl: 40
 Final Extension: 10 min 72°C
 [0071] Nach Behandlung mit Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I wurde das PCR-Produkt (= Standard, 359 Basenpaare) in die *Sma*I-Stelle von pUC18 kloniert.

6.2. Ermittlung einer Eichkurve

Vorwärts-Primer: CGATTAGCTGTTGGGCAACTT
 Rückwärts-Primer: ACCCTCTGTACCGACCATTTGTAT
 [0072] Mit diesen Primern wird eine Serie von PCR durchgeführt.
 [0073] Reaktionsbedingungen: wie oben, aber
 Template:
 350 Moleküle Standard
 5–1000 Zellen *Eikenella corrodens*
 Thermocycler, Temperaturprofil und Zyklen wie oben.
 Produkte: Standard (359 Basenpaare), Bakterien-PCR-Produkt (410 Basenpaare)

6.3. Quantitative Bestimmung PCR-Produkte

6.3.1. Auftrennung der Produkte von 6.2. auf 2% Agarosegel, Anfärben mit Ethidiumbromid, videodensitometrische Bestimmung der Mengen der beiden PCR-Produkte

6.3.2

[0074] (Bei Verwendung des Rückwärts-Primers in 5'-biotinylierter Form) nach Teilung des PCR-Produkts in zwei Aliquote Bindung an mit Streptavidin beschichtetes Reaktionsgefäß (Mikrotiterplatte), Denaturierung mit NaOH, Hybridisierung mit je einer Digoxigeninmarkierten DNA-Sonde,
 eine spezifisch für die Sequenz, die den Amplifikaten von *Eikenella corrodens*-DNA und Standard gemeinsam ist (DIG-AACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATG) und
 eine die an die Sequenz bindet, die im PCR-Produkt von *Eikenella corrodens*-DNA, nicht aber im PCR-Produkt vom Standard vorhanden ist (DIG-GGATGACGTCAAGTCCTCATGGCCCTTATG).
 [0075] Anschließend absorptionsphotometrische quantitative Bestimmung der gebundenen Sondenmenngen mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent assay (ELISA) unter Verwendung Peroxidase-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper; Auswertung im Mikrotiterplattenphotometer (Anthos).

6.4. Erstellen einer Eichkurve

[0076] Auftragen des Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Bakterien gegen die vorgelegte Bakterienzahl (unter Berücksichtigung von 7 Kopien des 16S

rRNA-Gens je Bakteriengenom).

6.5. Quantitative Bestimmung von *Eikenella corrodens*

- 5 wie unter 6.2 aber anstelle der *Eikenella corrodens* Zellen 2 µl bakterienhaltige Probe.
 Behandlung der PCR-Produkte wie unter 6.3.
 Auswertung des gemessenen Quotienten der PCR-Produktmengen von Standard und Probe mittels Eichkurve (6.4.).

Patentansprüche

1. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von *Streptococcus mutans* **dadurch gekennzeichnet**, daß eine biologische Probe entnommen wird, in einen Ansatz einer kompetitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an für *Streptococcus mutans* spezifischen Teilsequenzen im 16S-rRNA-Gen binden und der Ansatz eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Vorwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Rückwärts-Primers trägt, hergestellt wurde und der an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebstoffe enthält, der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 40 mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird: initiale Denaturierung: 10 min 95°C, Denaturierung: 1 min 95°C, Annealing: 1 min 55°C, Extension: 1 min 72°C, Final Extension: 10 min 72°C und quantitativ die beiden entstandenen Produkte entweder nach Auftrennung der Amplifikate in der Agarosegelelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigeninmarkierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper bestimmt werden und anschließend aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Menge des zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.
2. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von *Actinobacillus actinomycetemcomitans* dadurch gekennzeichnet, daß eine biologische Probe entnommen wird, in einen Ansatz einer kompetitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an für *Actinobacillus actinomycetemcomitans* spezifischen Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden, und der Ansatz eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Rückwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz

bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Vorwärts-Primers trägt, hergestellt wurde und der an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebstoffe enthält, der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 40 mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird: initiale Denaturierung: 10 min 95°C, Denaturierung: 1 min 95°C, Annealing: 1 min 55°C, Extension: 1 min 72°C, Final Extension: 10 min 72°C und quantitativ die beiden entstandenen Produkte entweder nach Auftrennung der Amplifikate in der Agarosegelelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigeninmarkierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper bestimmt werden und anschließend aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Menge des zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.

3. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von *Porphyromonas gingivalis* dadurch gekennzeichnet, daß eine biologische Probe entnommen wird, in einen Ansatz einer kompetitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an für *Porphyromonas gingivalis* spezifischen Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden und der Ansatz eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Rückwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Vorwärts-Primers trägt, hergestellt wurde und der an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebstoffe enthält, der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 40 mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird: initiale Denaturierung: 10 min 95°C, Denaturierung: 1 min 95°C, Annealing: 1 min 55°C, Extension: 1 min 72°C, Final Extension: 10 min 72°C und quantitativ die beiden entstandenen Produkte entweder nach Auftrennung der Amplifikate in der Agarosegelelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigeninmarkierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper bestimmt werden und anschließend aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Menge des zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.

4. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Pre-

votella intermedia dadurch gekennzeichnet, daß eine biologische Probe entnommen wird, in einen Ansatz einer kompetitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an für *Prevotella intermedia* spezifischen Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden und der Ansatz eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Vorwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Rückwärts-Primers trägt, hergestellt wurde und der an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebstoffe enthält, der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 40 mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird: initiale Denaturierung: 10 min 95°C, Denaturierung: 1 min 95°C, Annealing: 1 min 60°C, Extension: 1 min 72°C, Final Extension: 10 min 72°C und quantitativ die beiden entstandenen Produkte entweder nach Auftrennung der Amplifikate in der Agarosegelelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigeninmarkierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper bestimmt werden und anschließend aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Menge des zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.

5. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von *Eikenella corrodens* dadurch gekennzeichnet, daß eine biologische Probe entnommen wird, in einen Ansatz einer kompetitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an für *Eikenella corrodens* spezifischen Teilsequenzen im 16S rRNA-Gen binden und der Ansatz eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Vorwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Rückwärts-Primers trägt, hergestellt wurde und der an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebstoffe enthält, der Ansatz einschließlich der biologischen Probe 40 mal folgendem Temperaturregime unterworfen wird: initiale Denaturierung: 10 min 95°C, Denaturierung: 1 min 95°C, Annealing: 1 min 55°C, Extension: 1 min 72°C, Final Extension: 10 min 72°C und quantitativ die beiden entstandenen Produkte entweder nach Auftrennung der Amplifikate in der Agarosegelelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidium-

bromid durch Videodensitometrie oder bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigeninmarkierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper bestimmt werden

und anschließend aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Menge des zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.

6. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien nach den Ansprüchen 1 bis 5 in ihrer Summe, dadurch gekennzeichnet, daß eine biologische Probe entnommen wird, in einen Ansatz einer kompetitiven quantitativen PCR gegeben wird, der Vorwärts- und Rückwärts-Primer enthält, die an in 16S rRNA-Genen von Eubakterien hochkonservierte Teilsequenzen binden, und der eine definierte Menge einer Standard-DNA enthält, die in einer vorangegangenen PCR-Reaktion unter Verwendung von Vorwärts- oder Rückwärts-Primer und einem Hybrid-Primer, der an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer amplifizierten Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Vorwärts-, oder Rückwärts-Primers trägt, hergestellt worden sind

und der an sich bekannte, für die PCR erforderliche Hilfs- und Nebstoffe enthält,

der Ansatz einschließlich der biologischen Probe wiederholt einem Temperaturregime unterworfen wird und quantitativ die beiden entstandenen Produkte entweder nach Auftrennung der Amplifikate in der Agarosegelelektrophorese und DNA-Färbung mittels Ethidiumbromid durch Videodensitometrie oder bei Verwendung eines der beiden PCR-Primer in 5'-biotinylierter Form nach Immobilisieren an fixiertem Streptavidin durch Hybridisierung mit zwei an verschiedene Produktsequenzen bindende, Digoxigeninmarkierte Sonden mittels Enzyme-linked Oligonukleotide Sorbent Assay unter Verwendung Enzym-gekoppelter Anti-DIG-Antikörper bestimmt werden

und anschließend aus dem Verhältnis der beiden Produktkonzentrationen und der bekannten Menge des zum PCR-Ansatz zugegebenen Standards die DNA-Menge der Probe ermittelt wird.

7. Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Eubakterien nach Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die für die Primerbindung benutzten in 16S rRNA-Genen von Eubakterien hochkonservierten Teilsequenzen 282 Basenpaare voneinander entfernt sind.

8. Verfahren nach Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Menge Standard-DNA mit Hilfe bekannter absorptionsphotometrischer Methoden vorab bestimmt wird und zur erwarteten Menge Bakterien-DNA in der Probe korreliert wird.

9. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Hybrid-Primer an eine Basenfolge innerhalb der mit Vorwärts- und Rückwärts-Primer an E. coli DNA amplifizierten

Templatesequenz bindet und an seinem 5'-Ende die Sequenz des Vorwärts- oder Rückwärts-Primers trägt.

10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die quantifizierten Bakterien im tierischen oder menschlichen Verdauungstrakt vorkommen.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Prinzip der Herstellung des homologen internen Standards

